

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年11月4日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/094448 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07H 21/02, 21/04, A61K 31/7115, A61P 37/06, 19/02, 43/00, 29/00, 3/10, 25/00, 7/06, 21/04, 17/00, 1/04, 11/06, 37/08, 31/04, 9/10, C12N 15/11

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 佐藤 由紀夫 (SATO, Yukio) [JP/JP]; 〒9608134 福島県福島市上浜町 16-31 Fukushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005935

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 浩子 (KOBAYASHI, Hiroko) [JP/JP]; 〒9608116 福島県福島市春日町 17-19-301 Fukushima (JP).

(22) 国際出願日: 2004年4月23日 (23.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-118999 2003年4月23日 (23.04.2003) JP

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大正製薬株式会社 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1708633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 Tokyo (JP).

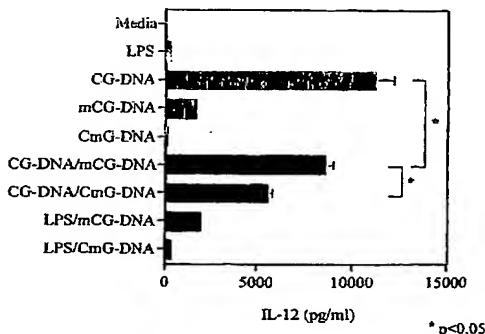
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,

[続葉有]

(54) Title: METHYLATED CpG POLYNUCLEOTIDE

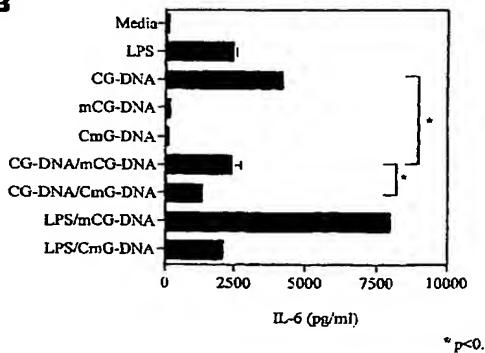
(54) 発明の名称: メチル化 CpG ポリヌクレオチド

A



(57) Abstract: A polynucleotide capable of effectively suppressing the immunoactivity attributed to DNA having a CpG motif to thereby find application in the prevention and/or treatment of immunologic diseases such as articular inflammation. In particular, a polynucleotide comprising a CpG motif having a guanine methylated, and a pharmaceutical composition comprising the polynucleotide.

B



(57) 要約: 本発明の目的は、CpG モチーフを有する DNA による免疫活性を効果的に抑制することができ、それにより関節炎などの免疫疾患の予防および/又は治療のために用いることができるポリヌクレオチドを提供することである。本発明によれば、グアニンがメチル化されている CpG モチーフを含むポリヌクレオチド、及び該ポリヌクレオチドを含む医薬組成物が提供される。

WO 2004/094448 A1

BEST AVAILABLE COPY



NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

メチル化C p Gポリヌクレオチド

技術分野

本発明は、C p Gモチーフの免疫活性を抑制する作用を有するポリヌクレオチドに関する。より詳細には、本発明は、C p G モチーフの免疫活性を抑制する作用を有し、関節炎などの免疫疾患の予防および／又は治療のために用いることができるポリヌクレオチド、並びに該ポリヌクレオチドを有効成分として含む医薬組成物に関する。

背景技術

微生物由来の成分は免疫活性を有するが、特に結核菌の菌体成分の中に多く含まれるDNAは強い自然免疫活性化作用を有し、抗原に対しT helper 1タイプの免疫反応を誘導するアジュバントとして働くことが知られている(Science 273; 352-354, 1996)。そして、このDNAの免疫活性化作用はC p Gモチーフを有するDNA (C p G DNA) に由来し、配列の変更あるいはシトシンのメチル化によってその免疫活性は失われることが知られている (Nature 374; 546-549, 1995)。

一方、この微生物由来DNAが関節リウマチを始めとする自己免疫疾患の病態に関わっている可能性を示唆する報告もある (Arthritis Rheum 43; 2578-2582, 2000, Nature 416; 603-607, 2002)。

また、特表2002-521489号公報には、C p G含有DNAのS立体異性体が免疫を刺激することができ、ワクチンアジュバントとして使用したり、ウイルス疾患、寄生生物疾患又は真菌疾患の予防又は治療のための免疫活性化因子として使用したり、あるいは癌、アレルギー疾患又は喘息の免疫治療のために使用できることが記載されている。さらに、特表2002-521489号公報には、C p G含有DNAのR立体異性体が上記したS立体異性体の免疫刺激効果を

抑制できることが記載されている。

発明の開示

本発明の目的は、CpGモチーフを有するDNAによる免疫活性を効果的に抑制することができ、それにより関節炎などの免疫疾患の予防および/又は治療のために用いることができるポリヌクレオチド、並びに該ポリヌクレオチドを有効成分として含む医薬組成物を提供することである。

本発明者らは、上記目的を達成すべく銳意研究した結果、グアニンをメチル化したCpGモチーフを含むDNAをマウス骨髄由来マクロファージに投与することにより、インターロイキン6 (IL-6) 及び12 (IL-12) の產生が効果的に抑制できることを見出した。さらに本発明者らは、グアニンをメチル化したCpGモチーフを含むDNAを関節炎モデルマウスに投与することにより、関節炎を効果的に抑制できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

すなわち、本発明によれば、グアニンがメチル化されているCpGモチーフを含む、ポリヌクレオチドが提供される。

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドの長さは8～100ヌクレオチドである。

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1から4のいずれかに記載の塩基配列を含有し、さらに好ましくは、配列番号1から4のいずれかに記載の塩基配列から成る。

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のポリヌクレオチドを有効成分として含む、医薬組成物が提供される。

好ましくは、本発明の医薬組成物は、免疫疾患の予防および/又は治療のための医薬組成物である。さらに好ましくは、本発明の医薬組成物は、免疫抑制剤又は関節炎の治療剤として使用することができる。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のポリヌクレオチドを有効

成分として含む、インターロイキン産生抑制剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、グアニンがメチル化されているCpGモチーフを含むポリヌクレオチドの有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、免疫疾患を予防および／又は治療する方法、免疫を抑制する方法、関節炎を治療する方法、並びにインターロイキン産生を抑制する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、免疫疾患の予防および／又は治療のための医薬組成物、免疫抑制剤、関節炎の治療剤、又はインターロイキン産生抑制剤の製造のための、グアニンがメチル化されているCpGモチーフを含むポリヌクレオチドの使用が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、mCG-DNAあるいはCmG-DNAによるマクロファージからのIL-12及びIL-6誘導抑制の結果を示す。

図2は、タイプIIコラーゲン関節炎モデルマウスにおけるCmG-DNAの効果を示す。day0は、最初の免疫時にCmG-DNAを投与したことを示し、day 21は3週間後の追加免疫の時にCmG-DNAを投与したことを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(ポリヌクレオチド)

本発明のポリヌクレオチドは、グアニンがメチル化されたCpGモチーフを含むことを特徴とするポリヌクレオチドである。本発明のポリヌクレオチドは、ポリリボヌクレオチドでもよいし、ポリデオキシリボヌクレオチドでもよい。本明細書で言うCpGモチーフとは、シトシン(C)とグアニン(G)からなる塩基配列である。本発明のポリヌクレオチドは、1本鎖又は2本鎖の何れでもよく、また、直鎖状又は環状の何れでもよい。本発明のポリヌクレオチドの長さは、免疫活性を抑制するという本発明の効果が達成できる限り特に限定されないが、細

胞への取り込みを容易にするという観点から、8～100ヌクレオチドであることが好ましく、さらに好ましくは8～30ヌクレオチドである。

CpGモチーフのCは、メチル化されていないシトシンを塩基として有するリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドでもよいし、メチル化されたシトシンを塩基として有するものでもよい。インターロイキン-6及びインターロイキン-12の產生抑制試験の結果から、本発明のポリヌクレオチドはメチル化されたシトシンを有するCpGモチーフを含むものであっても、メチル化していないシトシンを有するCpGモチーフを含むものであっても、同等の產生抑制作用を示すことが確認された。

CpGモチーフのメチル化されたGとは、メチル化されたグアニンを塩基として有するリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを意味する。メチル化される部位は、グアニンの2位、6位、7位などを挙げることができるが、好ましくは6位ケトン基のメチル化である。

CpGモチーフ以外のヌクレオチドは、ピリミジン又はプリンで置換されたリボース又はデオキシリボースであり、具体的には、グアニン、アデニン、シトシン、チミン又はウラシルを塩基として有するリボース又はデオキシリボースである。

本発明のポリヌクレオチドは、メチル化CpGモチーフの免疫抑制作用が損なわれない限り、ヌクレオチドの一部をヌクレオチドの誘導体と置換することによって、ポリヌクレオチド誘導体として使用することもできる。このようなポリヌクレオチド誘導体の具体例としては、ポリヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'～P5'ホスフォアミデート結合に変換されたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換さ

れたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のシトシンがC—5プロピニルシトシンで置換されたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシンで置換されたポリヌクレオチド誘導体、ポリヌクレオチド中のリボースが2'—O-プロピルリボースで置換されたポリヌクレオチド誘導体、あるいはポリヌクレオチド中のリボースが2'—メトキシエトキシリボースで置換されたポリヌクレオチド誘導体等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

本発明のポリヌクレオチドを有する核酸の基本配列は、5'-purine-purine-CmG-pyrimidine-pyrimidineを有し、具体的な配列としては、

5'-TCCATGACmGTTCCCTGATGCT-3' (配列番号1)

5'-TCCATGTCmGTCCTGATGCT-3' (配列番号2)

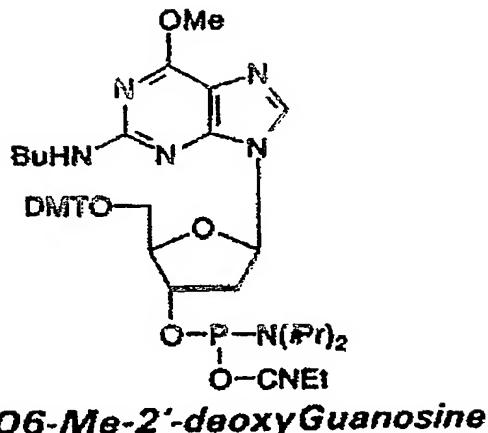
5'-GCTAGACmGTTAGCGT-3' (配列番号3)

5'-TCCATAACmGTTCCCTGATGCT-3' (配列番号4)

などを挙げることができる。

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子組み換え技術、核酸合成法、部位特異的変異導入法など当業者に公知の手法により作製することができる。例えば、ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体は、遺伝子工学で一般的に用いられる核酸合成法に従い、例えば、DNA合成装置を用いて直接合成してもよく、これらのポリヌクレオチドの一部を合成した後、PCR法又はクローニングベクター等を用いて増幅してもよい。さらに上記した通り、細胞内でより安定なポリヌクレオチド誘導体を得るために、塩基、糖、リン酸部分を化学修飾してもよい。前記ポリヌクレオチド合成法としては、リン酸トリエステル法、ホスホルアミダイト法、H-ホスホネート法等が挙げられる。

グアノシンの6位がメチル化されたポリヌクレオチドは、例えば、



を原料とすることにより製造することができる。

(免疫疾患の予防又は治療のための医薬組成物)

本発明によるグアニンがメチル化されているCpGモチーフを含むポリヌクレオチドは、本明細書中の試験例で示すように、マウス骨髄由来マクロファージをCpG DNA等で刺激した際のインターロイキン産生を抑制し、さらにマウスタイプIIコラーゲン関節炎モデルマウスにおいて関節炎を抑制することが確認された。即ち、本発明によれば、グアニンがメチル化されているCpGモチーフを含むポリヌクレオチドを有効成分として含む、医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は免疫抑制作用を有し、免疫疾患の予防および/又は治療のために用いることができる。本発明の医薬組成物は、例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、糖尿病、多発性硬化症、橋本病、溶血性貧血、重症筋無力症、強皮症、潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病等の自己免疫疾患、慢性気管支喘息、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患、移植片対宿主病、臓器移植時の拒絶反応、エンテロトキシンによる免疫系の活性化が病因子とされている急性感染症、又は動脈硬化の予防および

／又は治療のために用いることができる。また別の観点によれば、本発明のポリヌクレオチドは、インターロイキン産生抑制剤として用いることもできる。

本発明のポリヌクレオチドを医薬組成物の形態で使用する場合、上記ポリヌクレオチドを有効成分として使用し、さらに薬学的に許容可能な担体、希釈剤、安定化剤、賦形剤などを用いて医薬組成物を調製することができる。

本発明の医薬組成物を患者へ投与する場合、投与経路は特に限定されず、経口投与又は非経口投与の何れでもよく、当業者に公知の方法により行うことができる。好ましい投与経路は、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などである。

経口投与の場合には、本発明の医薬組成物は、例えば錠剤、硬質又は軟質ゼラチンカプセル、溶液、乳剤、又は懸濁液などのような、経口投与に適した製剤形態で用いることができる。また、非経口投与の場合には、本発明の医薬組成物は、例えば座薬の形態で直腸に投与してもよいし、または例えば注射用溶液の形態で動脈内注射、静脈内注射又は皮下注射により投与することができる。

本発明の医薬組成物を製造するためには、本発明のポリヌクレオチドを、例えば、薬学的に許容可能な賦形剤と配合することができる。このような錠剤およびゼラチンカプセル用の賦形剤の具体例としては、ラクトース、コーンスターーチ又はその誘導体、ステアリン酸またはそれらの塩などが挙げられる。溶液を製造するのに適した賦形剤は、水、ポリオール、スクロース、転化糖およびグルコースである。注射溶液に適した賦形剤は、水、アルコール、ポリオール、グリセロールおよび植物油である。座薬に好適な賦形剤は、植物および硬化油、ワックス、脂肪および半液体状ポリオールである。また、本発明の医薬組成物には、所望により、防腐剤、溶媒、安定剤、湿润剤、乳化剤、甘味料、染料、香味料、浸透圧を変化させるための塩、緩衝剤、コーティング剤、酸化防止剤、および場合によっては他の治療活性を有する化合物を配合することもできる。

本発明のポリヌクレオチドの投与量は、患者の体重、年齢、投与方法などのより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。有効成分であるポリヌクレオチドの投与量としては、一般的には1回につき0.1～

100mg/kg程度である。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例

試験例 1

(方法)

BMDMの誘導とサイトカインの測定は、Martin-Orozcoらの方法に準じて行った（Int Immunol 1999, 11: 1111-1118）。

BALB/cマウスの骨髄細胞から誘導したbone marrow derived macrophage (BMDM)を 2×10^5 /mlに調整し、CG-DNA (1 μ g/ml)、mCG-DNA (10 μ g/ml)、CmG-DNA (10 μ g/ml)、LPS (100 ng/ml, E. coli 0111:B4 (Sigma L-4391))と共にDMEM培地 (sigma社) にて24時間培養した。24時間後に回収した培養上清中のIL-12及びIL-6濃度をELISAにて測定した（図1）。有意差検定はStatViewを用いて行った。

なお、合成DNA（いすれも5'-S化リシン酸化、1microHPLC精製品）は、 β -シアノエチルアミダイト法により合成し、当業者が通常行う方法により精製したものを用いた。

CpGモチーフを含むDNA (CG-DNA) :

5'-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3' (配列番号5)

CpGモチーフのCをメチル化したDNA (mCG-DNA) :

5'-TCCATGAmCGTCCTGATGCT-3' (配列番号6)

CpGモチーフのGをメチル化したDNA (CmG-DNA) :

5'-TCCATGACmGTTCCTGATGCT-3' (配列番号1)

(試験例において、mC: 5-methyl-2'-deoxycytidine、mG: 06-methyl-2'-deoxyguanosineを表す。)

(結果)

マウス骨髄由来マクロファージを *in vitro* で LPS 又は CG-DNA と共に、mCG-DNA 又は CmG-DNA を添加して培養した。24 時間後の培養上清中の IL-12 及び IL-6 濃度を測定した。CG-DNA によるマクロファージからの IL-12 及び IL-6 誘導は、mCG-DNA あるいは CmG-DNA によって抑制されたが、CmG-DNA の方が mCG-DNA より抑制効果が高かった。また、LPS による IL-6 誘導を CmG-DNA は抑制せず、mCG-DNA はかえって増強することが示された。

試験例 2

(方法)

マウスタイプIIコラーゲン関節炎モデル試験は、*Current protocols in immunology: 15.5.1-15.5.14.* に準じて行った。

DBA/1LacJマウス（8週齢雌）をタイプIIコラーゲン (CII)（高研）及び Complete Freund Adjuvant (DIFCO) で免疫し、その3週間後にタイプIIコラーゲン及び Incomplete Freund Adjuvant で追加免疫し、タイプIIコラーゲン関節炎モデルを作成した。

このマウスに下記の如く合成DNAを皮下投与し、週1回関節炎スコアを測定した。関節炎スコアは、*Current protocols in immunology*に従った。

表 1 :

	投与量	投与方法
CII	200 µg	s.c.; at the hip
CFA	equal volume to CII	s.c.; at the hip
IFA	equal volume to CII	s.c.; at the hip
CmG	50 µg	i.d.; at the base of the tail

C II : タイプIIコラーゲン

CFA : 完全フロイントアジュバンド

I FA : 不完全フロイントアジュバンド

CmG : CmG-DNA

表2 :

	day 0	day +21
CII	CII/CFA	CII/I FA
CII/CmG (0)	CII/CFA+CmG	CII/I FA
CII/CmG (21)	CII/CFA	CII/I FA+CmG

(結果)

最初の免疫 (day 0) 、あるいは3週間後の追加免疫時 (day 21) に CmG-DNA を投与すると、関節炎が抑制された。

以上の結果から CmG-DNA は特異的に、かつこれまで知られた合成DNA以上に効果的に toll like receptor (TLR) 9を阻害し、自己免疫性疾患の治療に有用と考えられた。

産業上の利用可能性

本発明のポリヌクレオチドは、CpG-DNAによるIL-6及びIL-12の産生を効果的に抑制するため、関節リウマチ等の自己免疫疾患、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患、多発性骨髄腫、メサンギウム増殖性腎炎などの予防・治療に利用することができる。

請求の範囲

1. グアニンがメチル化されているC p Gモチーフを含む、ポリヌクレオチド。
2. 長さが8～100ヌクレオチドである、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
3. 配列番号1から4のいずれかに記載の塩基配列を含有する、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
4. 配列番号1から4のいずれかに記載の塩基配列から成る、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
5. 請求項1から4のいずれかに記載のポリヌクレオチドを有効成分として含む、医薬組成物。
6. 免疫疾患の予防および／又は治療のための医薬組成物である、請求項5に記載の医薬組成物。
7. 免疫抑制剤である、請求項5又は6に記載の医薬組成物。
8. 関節炎の治療剤である、請求項5又は6に記載の医薬組成物。
9. 請求項1から4のいずれかに記載のポリヌクレオチドを有効成分として含む、インターロイキン産生抑制剤。

図 1

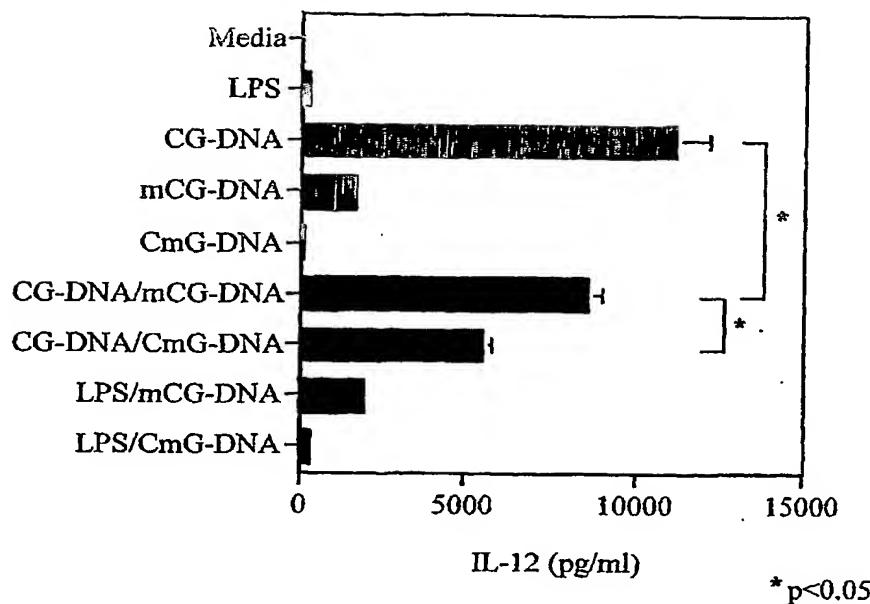
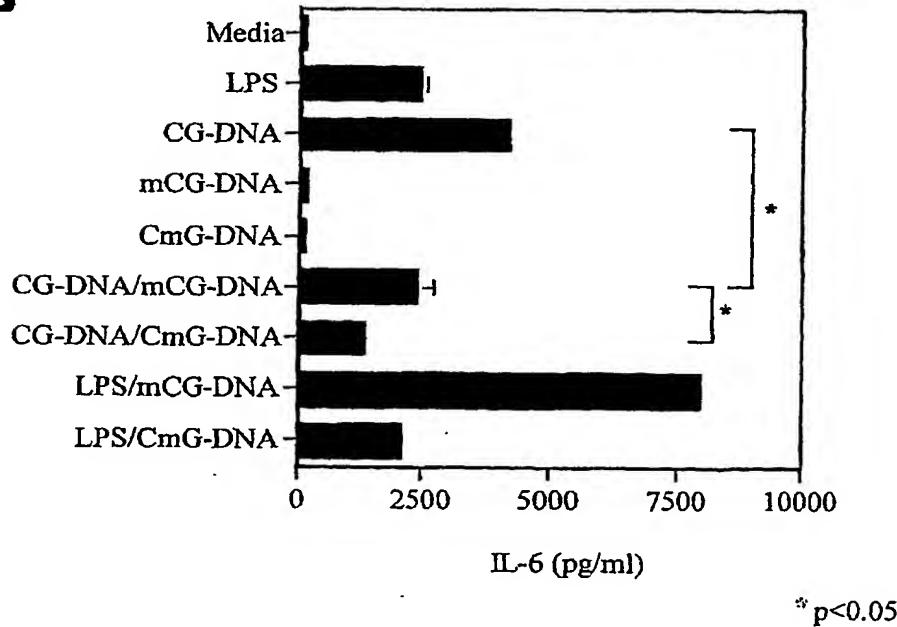
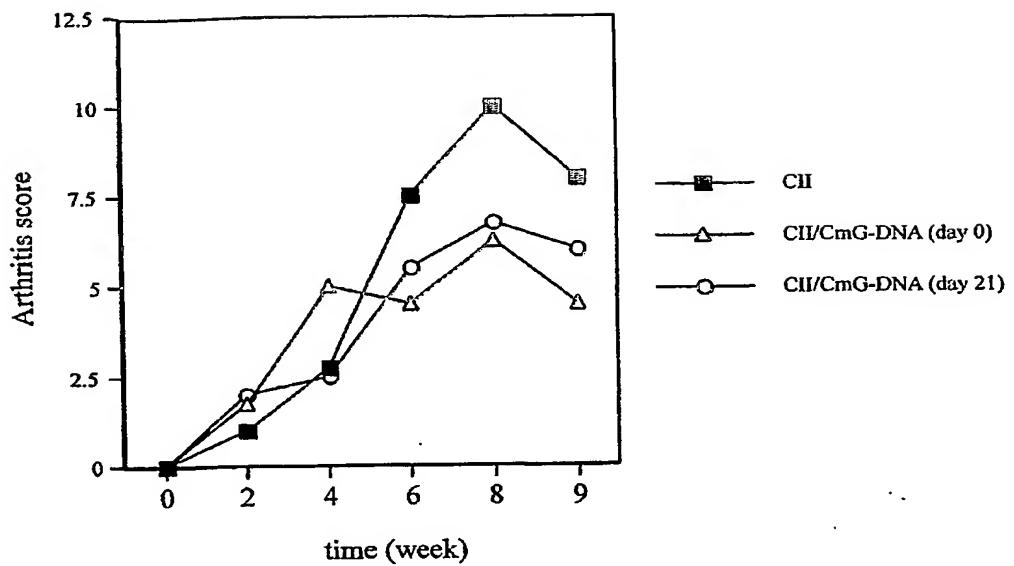
A**B**

図 2



SEQUENCE LISTING

<110>Yukio Sato

<110>TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120>methylated CpG polynucleotide

<130>A41216A

<160>6

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified base

<222>9

<223>06-methyl-2'-deoxyguanosine

<400>1

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified base

<222>9

<223>06-methyl-2'-deoxyguanosine

<400>2

tccatgtcggt ccctgatgct 20

<210>3

<211>15
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>modified base
<222>8
<223>06-methyl-2' -deoxyguanosine
<400>3
gctagacgtt agcgt 15
<210>4
<211>20
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>modified base
<222>9
<223>06-methyl-2' -deoxyguanosine
<400>4
tccataacgt tcctgatgct 20
<210>5
<211>20
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<400>5
tccatgacgt tcctgatgct 20
<210>6
<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>modified base

<222>8

<223>5-methyl-2' -deoxycytidine

<400>6

tccatgacgt tcctgatgct

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005935

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ C07H21/02, 21/04, A61K31/7115, A61P37/06, 19/02, 43/00, 29/00, 3/10, 25/00, 7/06, 21/04, 17/00, 1/04, 11/06, 37/08, 31/04, 9/10, C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ C07H21/02, 21/04, A61K31/7115, A61P37/06, 19/02, 43/00, 29/00, 3/10, 25/00, 7/06, 21/04, 17/00, 1/04, 11/06, 37/08, 31/04, 9/10, C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KALNIK, Matthew W. et al., <i>O⁶-Ethylguanine carcinogenic lesions in DNA: An NMR study of O⁶etG-C pairing in dodecanucleotide duplexes</i> , <i>Biochemistry</i> , 1989, Vol.28, No.15, pages 6182 to 6192, Chart I	1,2,5 3,4,6-9
X A	KAWAI, Kiyohiko et al., <i>Intrastrand 2'β hydroxyl abstraction of 5'-adjacent deoxyguanosine by deoxyuridin-5-yl in Z-form DNA</i> , <i>Tetrahedron Letters</i> , 1999, Vol.40, No.13, pages 2589 to 2592, compound 3	1,2,5 3,4,6-9
X A	LEE, Seok Ho et al., <i>DNA microstructural requirements for neocarzinostatin chromophore-induced direct strand cleavage</i> , <i>Nucleic Acids Research</i> , 1989, Vol.17, No.14, pages 5809 to 5825; table III.-V.	1,5 2-4,6-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 July, 2004 (01.07.04)

Date of mailing of the international search report
20 July, 2004 (20.07.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/005935

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAO, Qiuyan et al., Site of chemical modifications in CpG containing phosphorothioate oligodeoxynucleotide modulates its immunostimulatory activity, <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> , 1999, Vol.9, pages 3453 to 3458	1-9
A	WO 03/027313 A2 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES), 03 April, 2003 (03.04.03), (Family: none)	1-9
A	JP 2003-510290 A (Coley Pharmaceutical Group, Inc.), 18 March, 2003 (18.03.03), & WO 01/022990 A2 & EP 1220684 A2 & ZA 2002001959 A	3,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005935

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07H 21/02, 21/04, A61K 31/7115, A61P 37/06, 19/02, 43/00, 29/00, 3/10, 25/00, 7/06, 21/04, 17/00, 1/04, 11/06, 37/08, 31/04, 9/10, C12N 15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07H 21/02, 21/04, A61K 31/7115, A61P 37/06, 19/02, 43/00, 29/00, 3/10, 25/00, 7/06, 21/04, 17/00, 1/04, 11/06, 37/08, 31/04, 9/10, C12N 15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	KALNIK, Matthew W. et al., O^6 -Ethylguanine carcinogenic lesions in DNA: An NMR study of O^6 etG-C pairing in dodecanucleotide duplexes, Biochemistry, 1989, Vol. 28, No. 15, p. 6182-6192 Chart Iを参照。	1, 2, 5 3, 4, 6-9
X A	KAWAI, Kiyohiko et al., Intrastrand 2' β hydrogen abstraction of 5'-adjacent deoxyguanosine by deoxyuridin-5-yl in Z-form DNA, Tetrahedron Letters, 1999, Vol. 40, No. 13, p. 2589-2592 化合物3を参照。	1, 2, 5 3, 4, 6-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.07.2004

国際調査報告の発送日

20.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4P 9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	LEE, Seok Ho et al., DNA microstructural requirements for neocarzinostatin chromophore-induced direct strand cleavage, Nucleic Acids Research, 1989, Vol. 17, No. 14, p. 5809-5825 Table III. -V. を参照。	1, 5 2-4, 6-9
A	ZHAO, Qiuyan et al., Site of chemical modifications in CpG containing phosphorothioate oligodeoxynucleotide modulates its immunostimulatory activity, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, Vol. 9, p. 3453-3458	1-9
A	WO 03/027313 A2 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2003. 04. 03 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2003-510290 A (コーリー ファーマシューティカル グループ, インコーポレーテッド) 2003. 03. 18 & WO 01/022990 A2 & EP 1220684 A2 & ZA 2002001959 A	3, 4

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant:

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.